

油橄榄叶抗糖尿病活性部位筛选

张佳^{1,2}, 卜令娜^{2,3}, 裴栋², 刘晔玮³, 任远^{1*}, 邸多隆^{1,2*}

1. 甘肃中医学院 药理学系 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000

2. 中国科学院兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 兰州大学公共卫生学院 营养与食品卫生研究所, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 筛选油橄榄叶抗糖尿病活性部位。方法 应用回流提取法和大孔吸附树脂技术, 从油橄榄叶中提取 6 个部位 (A~F)。对 6 个部位进行 α -淀粉酶抑制实验、蛋白质非酶糖基化抑制实验和四氧嘧啶致小鼠糖尿病模型实验, 综合评价和筛选抗糖尿病活性部位。结果 C~F 部位对 α -淀粉酶、蛋白质非酶糖基化均显示明显的抑制活性, 其中以 D 部位活性最强, 且呈量效关系。C、D 部位降血糖作用较明显, 且以 D 部位活性最显著。结论 油橄榄叶具有潜在抗糖尿病活性, 其中 D 部位的活性尤为显著。

关键词: 油橄榄叶; 抗糖尿病活性; α -淀粉酶; 蛋白质非酶糖基化; 四氧嘧啶; 糖尿病模型

中图分类号: R977.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)13-1807-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.019

Screening for anti-diabetic effective fraction in leaves of *Olea europaea*

ZHANG Jia^{1,2}, BU Ling-na^{2,3}, PEI Dong², LIU Ye-wei³, REN Yuan¹, DI Duo-long^{1,2}

1. Gansu Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicines, Department of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

3. Institute of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To screen the anti-diabetic effective fraction in the leaves of *Olea europaea*. **Methods** Different fractions (Frs. A—F) were prepared using reflux extraction and separation with macroporous resins. α -Amylase system, non-enzymatic glycation system, and alloxan-induced diabetic models of mice were used to evaluate the anti-diabetic activities of the different fractions, respectively. **Results** Frs. C—F fractions showed the significant inhibitory activities against α -amylase system and non-enzymatic glycation system. Especially, fraction D showed the best anti-diabetic activity compared with the other fractions, which also displayed a good dose-effect relationship. The anti-diabetic activities of Frs. C and D were both obvious and Fr. D showed more significance. **Conclusion** The leaves of *O. europaea* show the potential anti-diabetic activity and the most effective fraction is ascribed to Fr. D.

Key words: leaves of *Olea europaea*; anti-diabetic activity; α -amylase; non-enzymatic glycosylation of protein; alloxan; diabetic model

油橄榄 *Olea europaea* L. 为木犀科 (Oleaceae) 常绿乔木, 是世界著名的木本油料树种, 主要分布在地中海国家希腊、意大利、突尼斯、西班牙等地。自 1964 年以来, 我国开始陆续引种油橄榄品种 100 多个, 现主要分布在四川、甘肃、福建、江苏、广

东等地^[1]。油橄榄鲜果可加工制得橄榄油, 而其叶 (尤其每年冬季油橄榄树修枝时产生的大量油橄榄叶) 的利用还不充分^[2]。本课题组前期研究表明, 油橄榄叶中的化学成分包括裂环烯醚萜类、黄酮类、游离醇、甾醇、烷烃类等, 其中裂环烯醚萜类化合

收稿日期: 2012-12-04

基金项目: 中国科学院“百人计划”资助项目 (2007-0629141051); 国家自然科学基金资助项目 (20974116)

作者简介: 张佳 (1987—), 女, 硕士, 主要从事天然产物复杂体系分离分析新技术、新方法研究。Tel: 18658685530 E-mail: mmoby@163.com

*通信作者 任远 Tel: (0931)8765387 E-mail: ry@gszy.edu.cn

邸多隆 Tel: (0931)4968248 E-mail: didl@licp.cas.cn

物橄榄苦苷和黄酮类是其主要化学成分^[3]。药理研究表明,油橄榄叶具有降血压、抗菌、消炎、抗氧化等多种药理活性^[4]。季崇敏等^[5]的研究表明,油橄榄叶乙醇提取物及醋酸乙脂提取物具有降血糖和调节血脂的作用。但油橄榄叶抗糖尿病活性部位的研究鲜见报道。

本实验为筛选油橄榄叶抗糖尿病的活性部位,应用溶剂提取法和大孔吸收树脂技术提取到6个部位A~F,通过 α -淀粉酶抑制实验、蛋白质非酶糖基化抑制实验和四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型实验,对6个部位进行综合评价,以期从中筛选出抗糖尿病活性部位,为油橄榄叶深度开发和新药研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

油橄榄叶采于甘肃省陇南市,经中国科学院兰州化学物理研究所戚欢阳副研究员鉴定为木犀科植物油橄榄 *Olea europaea* L. 的叶;阿卡波糖,50 mg/片,拜耳医药保健有限公司,批号:BJ02543;盐酸二甲双胍片,深圳海王药业有限公司,批号:20101201;消糖灵胶囊,湖南正清制药集团股份有限公司,批号:1203201。

血糖测试条,长沙三诺生物传感技术股份有限公司;氨基胍,质量分数为98%,天津希恩思生化科技有限公司,批号:A53700AH40;牛血清白蛋白(BSA),科昊生物工程有限责任公司; α -淀粉酶,上海宝曼生物科技有限公司;马铃薯淀粉,上海强顺化学试剂有限公司;四氧嘧啶, Sigma 公司;乙醇,工业级,甘肃黄羊镇糖厂生产;其余试剂为分析纯;实验用水为蒸馏水;Sz-1大孔吸附树脂,西安蓝晓科技有限公司。

1.2 动物

昆明种小鼠,SPF级,6~8周龄,体质量18~22 g,雌雄不限,由甘肃中医学院科研中心动物室提供,许可证号:SCXK-(甘)-2011-0004。

1.3 仪器

RE-52C型旋转蒸发仪,巩义市英峪予华仪器厂;T6新世纪紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;BT224S型电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;LS55荧光分光光度计,美国Perkin Elmer公司;HH-CP-TW二氧化碳细胞培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;血糖仪,长沙三诺生物传感技术股份有限公司。

2 方法

2.1 油橄榄叶乙醇提取物的制备

油橄榄叶250 g,60%乙醇回流提取2次,每次1 h,滤过,合并2次滤液,减压回收乙醇,浓缩液用蒸馏水定容至1 000 mL(每毫升相当于原药材0.25 g),即得油橄榄叶提取液,备用。

2.2 各萃取部位的制备

取“2.1”项下的油橄榄叶提取液150 mL,减压真空干燥箱中(45℃)干燥,得部位A(得率相当于原药材的29.4%)。再量取油橄榄叶提取液150 mL,置已处理好的大孔吸附树脂柱(20 cm×2 cm,1 BV=20 mL),待其吸附完全后,用6 BV的蒸馏水洗脱,收集洗脱液,55℃下减压浓缩后置减压真空干燥箱中(45℃)干燥,得部位B(得率相当于原药材的3.8%)。量取油橄榄叶提取液150 mL,共4份,分别置于已处理好的大孔吸附树脂柱,待其吸附完全后,用6 BV蒸馏水洗脱,弃洗脱液,再分别用6 BV不同质量分数(30%、50%、70%、90%)乙醇洗脱,分别收集洗脱液,55℃下减压浓缩后置减压真空干燥箱中(45℃)干燥,分别得部位C、D、E、F(得率分别相当于原药材的9.6%、11.3%、3.4%、11.0%)。

2.3 α -淀粉酶活性抑制实验^[6]

样品管反应系统为25 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS,37℃,pH 7.0)配制的 α -淀粉酶溶液(50 mg/L)100 μ L,其分别与部位A~F(质量浓度均为30、40、50、60、70、80、90、100 mg/mL)150 μ L、阳性对照阿卡波糖(5 mg/mL)40 μ L于具塞试管中混匀,37℃水浴中反应10 min,加入0.04%可溶性淀粉水溶液500 μ L,继续在37℃水浴反应15 min,将具塞试管从水浴中取出,加入1.0 mol/L盐酸溶液300 μ L终止反应,再加入0.01 mol/L碘液200 μ L与反应液混合显色,用水稀释反应液最终体积至4 mL,以空白管调零,于波长660 nm处测定其吸光度(A)值。阴性对照管除不加部位A~F的样品溶液,阴性空白管除不加 α -淀粉酶而加淀粉外,均由水补足体积,其他反应同前。样品空白管除不加 α -淀粉酶而加淀粉外,均由水补足体积,其他操作同样品管。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率} = \frac{[(A_{\text{阴性空白管}} - A_{\text{阴性对照管}}) - (A_{\text{样品空白管}} - A_{\text{样品管}})]}{(A_{\text{阴性空白管}} - A_{\text{阴性对照管}})}$$

2.4 蛋白质非酶糖基化活性实验^[7-8]

在无菌条件下,样品管反应系统为0.2 mol/L

PBS (含 0.02% 迭氮钠, pH 7.4)、500 mmol/L 葡萄糖溶液、20 mg/L 牛血清白蛋白溶液各 1.0 mL, 分别与部位 A~F (30、40、50、60、70、80、90、100 mg/mL) 1.0 mL、阳性对照 25 mmol/L 氨基胍 1 mL 于 5 mL 离心管中混匀, 37 °C 恒温、有氧、避光条件下连续孵育 15 d, 从各管中吸取反应液 200 μ L, 用水稀释至 3.0 mL, 于最大激发波长 370 nm、最大发射波长 440 nm 条件下测定荧光值 (F)。阴性对照管处理及其他反应同前。

$$\text{蛋白质非酶糖基化抑制率} = (F_{\text{阴性对照管}} - F_{\text{样品管}}) / F_{\text{阴性对照管}}$$

2.5 四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型实验

小鼠 110 只, 禁食不禁水 24 h 后 ip 四氧嘧啶 200 mg/kg (溶于 0.9% 生理盐水), 4.5 h 后小鼠 ig 50% 葡萄糖溶液 0.5 mL/只, 72 h 后小鼠禁食不禁水 12 h, 尾端取血, 血糖仪检测各鼠血糖水平, ip 四氧嘧啶 50 mg/kg。第 7 天, 小鼠禁食不禁水 12 h, 尾端取血, 血糖仪检测小鼠血糖水平。取血糖值 $\geq$ 13.8 mmol/L 的小鼠随机分为模型组, 阳性对照 1 组 (二甲双胍 200 mg/kg), 阳性对照 2 组 (消糖灵 3.6 g/kg), 部位 C 高、中、低剂量 (1.20、0.6、0.3

g/kg) 组, 部位 D 高、中、低剂量 (0.80、0.4、0.2 g/kg) 组, 实验开始前预留对照组。药物用生理盐水溶解, 各组 ig 给药 20 mL/kg, 对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 每日给药 1 次, 连续 14 d。末次给药后各组小鼠禁食不禁水 24 h, 尾端取血, 血糖仪检测血糖水平。

2.6 统计分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析检验变异来源, 组间比较采用单因素方差分析及 t 检验。

3 结果

3.1 对 α -淀粉酶活性的影响

阿卡波糖对 α -淀粉酶有显著抑制作用, 5 mg/mL 时的抑制率为 74.1%。在质量浓度为 30~100 mg/mL 时, 油橄榄叶提取部位 A、C、D、E、F 对 α -淀粉酶均表现出一定的抑制作用, IC_{50} 分别为 249.0、49.3、34.1、55.0、39.3 mg/mL, 以 D 部位的抑制效果最显著且呈量效关系, 而 B 部位对 α -淀粉酶几乎无抑制作用。结果见表 1。

表 1 油橄榄叶不同提取部位对 α -淀粉酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of different fractions in *O. europaea* leaves on α -amylase activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	不同质量浓度 (mg·mL ⁻¹) 提取部位的抑制率 / %							
	30	40	50	60	70	80	90	100
部位 A	26.1 $\pm$ 1.4	26.5 $\pm$ 0.8	28.6 $\pm$ 1.1	29.5 $\pm$ 1.3	31.8 $\pm$ 0.5	36.6 $\pm$ 2.1	38.1 $\pm$ 1.8	38.8 $\pm$ 1.6
部位 B	5.6 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.3	8.1 $\pm$ 0.3
部位 C	27.5 $\pm$ 0.8	36.4 $\pm$ 0.6	48.0 $\pm$ 2.6	54.5 $\pm$ 2.3	66.7 $\pm$ 2.8	75.6 $\pm$ 4.3	85.6 $\pm$ 1.3	87.7 $\pm$ 2.6
部位 D	57.5 $\pm$ 0.3	60.0 $\pm$ 0.8	65.5 $\pm$ 2.1	70.0 $\pm$ 0.8	74.4 $\pm$ 1.0	85.2 $\pm$ 1.2	93.9 $\pm$ 1.8	96.9 $\pm$ 2.8
部位 E	19.5 $\pm$ 1.0	35.8 $\pm$ 1.1	45.9 $\pm$ 0.5	55.3 $\pm$ 1.3	60.9 $\pm$ 1.1	68.7 $\pm$ 3.6	72.9 $\pm$ 2.2	80.9 $\pm$ 1.8
部位 F	42.6 $\pm$ 0.7	54.4 $\pm$ 1.0	59.7 $\pm$ 1.0	65.1 $\pm$ 1.2	72.7 $\pm$ 1.4	79.6 $\pm$ 0.9	93.2 $\pm$ 0.3	94.7 $\pm$ 1.2

3.2 对蛋白质非酶糖基化活性的影响

氨基胍对非酶糖基化有显著抑制作用, 在浓度为 25 mmol/L 时抑制率为 58.5%。在质量浓度为 30~100 mg/mL 时, 油橄榄叶提取部位 A、C、D、E、F 对蛋白质非酶糖基化活性均表现出一定的抑制作用, IC_{50} 分别为 187.8、66.7、61.5、88.0、62.9 mg/mL, 以 D 部位的抑制效果最显著且呈现量效关系, 而 B 部位对蛋白质非酶糖基化活性无抑制作用。结果见表 2。

3.3 对小鼠血糖水平的影响

取在上述 2 项实验中作用较强的油橄榄叶提取

部位 C 和 D 进行此项实验。结果显示, 在造模第 7 天 (给药前), 模型组小鼠空腹血糖明显高于对照组 ($P < 0.01$), 提示糖尿病模型制备成功。给药第 14 天, 油橄榄叶 D 部位 3 个剂量组小鼠空腹血糖水平均低于模型组, 其中高剂量组的作用较为显著 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

4 讨论

α -淀粉酶是饮食中淀粉等主要碳水化合物消化、吸收的关键酶, 抑制其活性可以延缓人体对淀粉等物质的降解和葡萄糖的吸收, 从而抑制餐后血糖的快速升高。 α -淀粉酶抑制剂常被用于治疗 2 型

表2 油橄榄叶不同提取部位对蛋白质非酶糖基化活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 2 Effects of different fractions in *O. europaea* leaves on nonenzymatic glycosylation of protein ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	不同质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 提取部位的抑制率 / %							
	30	40	50	60	70	80	90	100
部位 A	—	—	—	—	—	—	28.1 ± 1.2	35.4 ± 1.0
部位 B	—	—	—	—	—	—	—	—
部位 C	—	20.9 ± 0.3	44.7 ± 1.6	46.0 ± 1.4	66.9 ± 1.9	79.4 ± 1.1	84.9 ± 0.7	89.9 ± 1.8
部位 D	—	25.2 ± 1.1	58.8 ± 2.7	71.6 ± 1.6	79.9 ± 3.5	87.3 ± 1.5	88.9 ± 2.2	93.6 ± 1.3
部位 E	—	—	—	—	53.0 ± 1.9	66.4 ± 2.6	75.7 ± 3.2	80.9 ± 2.3
部位 F	—	19.0 ± 0.6	48.9 ± 2.7	67.7 ± 2.3	78.2 ± 1.8	81.6 ± 2.9	88.4 ± 2.8	90.5 ± 2.0

表3 油橄榄叶提取部位 C、D 对四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of Frs. C and D in *O. europaea* leaves on blood sugar level of alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血糖 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
			给药第 0 天	给药第 14 天
对照	15	—	5.71 ± 0.61	6.29 ± 0.41
模型	11	—	$24.06 \pm 4.98^{**}$	$19.11 \pm 4.24^{**}$
C 部位	10	1.20	22.29 ± 5.34	16.35 ± 6.55
	9	0.60	24.68 ± 3.38	20.46 ± 6.22
	9	0.30	22.63 ± 5.82	18.97 ± 5.84
D 部位	12	0.80	21.88 ± 4.90	$13.29 \pm 6.45^{\Delta}$
	11	0.40	23.54 ± 5.25	17.79 ± 6.54
	12	0.20	23.44 ± 4.77	16.22 ± 6.25
二甲双胍	11	0.20	22.01 ± 5.65	15.24 ± 5.06
消糖灵	10	3.60	23.01 ± 5.36	15.62 ± 6.00

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs model group

糖尿病, 其能有效降低餐后血糖水平和减少糖尿病并发症的发生^[9]。蛋白质非酶糖基化是指在无需酶的参与下, 还原性糖的醛基与蛋白质氨基发生反应, 最终形成一系列不可逆的蛋白质糖基化终末产物 (AGEs), AGEs 严重干扰正常组织的结构与功能, 从而对机体造成广泛影响^[10]。蛋白质非酶糖基化不会因为血糖得到控制而停止, 所以最终造成糖尿病慢性并发症的发生和发展。

本实验通过建立 α -淀粉酶模型及蛋白质非酶糖基化模型, 研究油橄榄叶提取部位 A~F 对 α -淀粉酶及蛋白质非酶糖基化的抑制作用, 结果表明提取部位 C~F 对上述 2 各模型具有显著抑制活性, 其中以 C、D 部位活性较强, 且呈现良好的量效关系。为进一步验证油橄榄叶提取部位 C、D 的抗糖尿病活性, 利用四氧嘧啶制备糖尿病小鼠模型, 对这 2

个部位进行体内降血糖活性评价。结果表明, 油橄榄叶提取部位 D 剂量为 0.8 g/kg 时, 表现出较明显的降血糖活性, 提示油橄榄叶可能对糖尿病有积极的防治作用。急性毒性试验结果显示, 油橄榄叶提取部位 C、D 半数致死量均大于 10 g/kg ^[11], 提示油橄榄叶毒性较小。根据本实验结果和急性毒性试验结果, 认为油橄榄叶具有开发为有效的抗糖尿病新药的潜力。

参考文献

- [1] 王晓飞, 李 辰, 郑媛媛, 等. 油橄榄叶多酚类成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 848-851.
- [2] 李 辰, 郑媛媛, 黄新异, 等. UV-Vis 光谱差减法测定油橄榄叶中橄榄苦苷含量初探 [J]. 分析测试学报, 2011, 30(3): 242-247.
- [3] 郑媛媛, 李 辰, 封士兰. 油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨 [J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(2): 547-550.
- [4] W X F, Li C, Shi Y P, et al. Two new secoiridoid glycosides from the leaves of *Olea europaea* L. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(11): 940-944.
- [5] 季崇敏, 吴国球, 沈子龙. 橄榄叶提取物对正常及糖尿病小鼠血糖和血脂水平的影响 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2003, 22(4): 236-238.
- [6] Usupa S L, Prabhakar A R, Tandon S. α -Amylase inhibitors in foodstuffs [J]. *Food Chem*, 1989, 34: 95-101.
- [7] Wu J W, Hsieh C L, Wang H Y, et al. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds in the glycation process of protein [J]. *Food Chem*, 2009, 113(1): 78-84.
- [8] 王雅娟, 钱之玉, 沈祥春. 西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的抑制作用 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1202-1205.
- [9] 谢园沁, 陈伟平, 胡嘉磊. 蚕蛹油对糖尿病大鼠血糖和糖代谢相关酶的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1136-1141.
- [10] 谢文利, 万宗明, 李 玲. 原花青素-B₂ 对体内蛋白质非酶糖基化反应的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 749-751.
- [11] 孙文燕, 侯秀娟, 王 斌. 中药毒性分级概况与研究思路探讨 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2199-2201.